

Recombinant adenovirus of bone morphogenetic protein and its method for exciting bone generation

Publication number: CN1353185

Publication date: 2002-06-12

Inventor: LOU JUEREN (CN)

Applicant: ZHAOAN MEDICAL SCIENCE AND TEC (CN)

Classification:


- International: A61K39/235; A61P19/08; C12N7/01; C12N15/33;
A61K39/235; A61P19/08; C12N7/01; C12N15/33;
(IPC1-7): C12N7/01; A61K39/235; A61P19/08;
C12N15/33

- European:

Application number: CN20001027115 20001102

Priority number(s): CN20001027115 20001102

Also published as:

 CN1137993C (C)

[Report a data error here](#)

Abstract of CN1353185

A method and material for promoting bone growth, that is, a replication-defective virus and the protein in the bone morphogenetic protein family coded by the said virus are disclosed. The said virus is chosen from adenovirus, adeno-associated virus and retrovirus. The mesenchyme cell transfected by the said virus, the inoculum containing the mesenchyme cell, and the method for internally and externally promoting bone growth are disclosed.

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

<http://v3.espacenet.com/textdoc?DB=EPODOC&IDX¹=CN1353185&F=0>

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl.⁷

C12N 7/01

C12N 15/33 A61K 39/235

A61P 19/08

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 00127115.6

[43] 公开日 2002 年 6 月 12 日

[11] 公开号 CN 1353185A

[22] 申请日 2000.11.2 [21] 申请号 00127115.6
[71] 申请人 上海兆安医学科技有限公司
地址 200021 上海市淮海中路 283 号香港广场南
座 2005 室
[72] 发明人 楼觉人

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所
代理人 徐 迅

权利要求书 1 页 说明书 7 页 附图页数 6 页

[54] 发明名称 骨形态发生蛋白重组腺病毒及其激发骨
生成的方法

[57] 摘要

本发明公开了用于刺激骨生成的新方法和材料。具体地,公开了一种复制缺陷型的病毒,该病毒编码的骨形态发生蛋白家族中的蛋白,并且所述的病毒选自:腺病毒、腺伴随病毒和逆转录病毒。还公开了用所述病毒转染的间充质细胞,含该间充质细胞的接种物,以及在体内和体外刺激骨生成的方法。本发明可有效、方便和/或价廉地刺激骨生成。

ISSN 1008-4274

知识产权出版社出版

00.11.07

权 利 要 求 书

1.一种复制缺陷型的病毒，其特征在于，该病毒编码骨形态发生蛋白家族中的蛋白，并且所述的病毒选自：腺病毒、腺伴随病毒和逆转录病毒。

5 2.如权利要求 1 所述的病毒，其特征在于，所述的骨形态发生蛋白家族中的蛋白选自：BMP-2、BMP-4、BMP-7。

3.如权利要求 1 所述的病毒，其特征在于，所述的骨形态发生蛋白家族中的蛋白是 BMP-2。

4.如权利要求 1 所述的病毒，其特征在于，所述的病毒是重组腺病毒 5 型
10 Adv-BMP2，CCTCC 保藏号为 V200004。

5.一种转化的间充质细胞，其特征在于，它表达骨形态发生蛋白家族中的蛋白。

6.如权利要求 5 所述的间充质细胞，其特征在于，它是由权利要求 1-5 中任一权利要求所述的病毒转化的。

15 7.一种用于植入哺乳动物体内以刺激骨头生长的接种物，其特征在于，它含有权利要求 5 所述间充质细胞。

8.一种体外产生骨或骨组织前体的方法，其特征在于，它包括步骤：在适合细胞生长的条件下，培养权利要求 5 所述的间充质细胞，使其在体外分化成骨组织前体或骨母细胞。

20 9.一种在体内刺激骨生成的方法，其特征在于，它包括步骤：将权利要求 7 所述的接种物植入需要骨生成的部位。

00.11.07

说明书

骨形态发生蛋白重组腺病毒及其激发骨生成的方法

5 本发明涉及生物和医学领域,更具体地,本发明涉及骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)重组腺病毒,以及用所述腺病毒刺激骨生成的方法。

骨骼在哺乳动物中起着支架作用。由于种种原因,骨头会受到损伤,例如骨折和肿瘤破坏等。因此需要开发有效地刺激骨生成的方法以及相关材料和设备。

10 目前临床上,仍在采用从病人身体的某个部位采集骨组织,然后植入需要修复的部位的方法。这种方法使病人必须承受额外的手术痛楚。而在一些情况下,病人本身不能提供足够的骨组织供修复部位之用。

同时,在本发明之前,运用传统基因工程方法产生的 BMP(Bone Morphogenetic Protein)刺激骨生成都是按下述方法进行:

15 利用基因重组技术在体外生成 BMP(主要在 CHO 细胞表达系统)→用蛋白分离技术纯化 BMP 蛋白→BMP 蛋白混入固体载体(如胶原蛋白海绵)→植入病人或动物体内以刺激生骨。

然而,在上述方法中存在着如下缺点:

(1) BMP 在细胞内表达量低,因而制备蛋白成本高昂。

20 (2) BMP 蛋白置入体内后会被迅速酶解/降解,从而失去活性,因而要达到体内生骨所需的剂量极高(文献报道都在毫克级)。这与缺点(1)相加造成更高的成本。

(3)由于需要固体载体,因此必须进行外科手术予以植入。此外,植入部位必须有物理空间允许固体载体放入。这限制了上述方法的应用,并且对病人也造成了一定的痛楚。

25 因此,本领域长期以来迫切需要新的有效、方便和/或价廉的刺激骨生成的方法及其相关材料和设备。

30 本发明的一个目的是提供新的有效、方便和/或价廉的刺激骨生成的方法。较佳地,该方法对病人造成的痛楚小于现有技术。

本发明的另一目的是提供用于所述方法的材料。

本发明的再一目的是提供用本发明方法形成的骨或骨组织前体。

00.11.07

在本发明的第一方面，提供了一种复制缺陷型的病毒，该病毒编码表达骨形态发生蛋白家族中的蛋白，并且所述的病毒选自：腺病毒、腺伴随病毒和逆转录病毒。较佳地，所述的骨形态发生蛋白家族中的蛋白选自：BMP-2、BMP-4、
5 BMP-7。更佳地，所述的骨形态发生蛋白家族中的蛋白是BMP-2。

在本发明的第二方面，提供了一种转化的间充质细胞，它表达骨形态发生蛋白家族中的蛋白。较佳地，该间充质细胞是用本发明上述的病毒转化的。

在本发明的第三方面，提供了一种用于植入哺乳动物体内以刺激骨头生长的接种物，该接种物含有本发明上述的间充质细胞。

10 在本发明的第四方面，提供了一种体外产生骨或骨组织前体的方法，它包括步骤：在适合细胞生长的条件下，培养本发明所述的转化的间充质细胞，使其在体外分化成骨组织前体或骨母细胞。

在本发明的第五方面，提供了一种在体内刺激骨生成的方法，它包括步骤：将本发明上述的接种物植入需要骨生成的部位。

15

附图中，

图1显示了重组腺病毒Adv-BMP2的构建过程。

图2显示了在体外Adv-BMP2在间充质细胞中的表达。

图3显示了在体外Adv-BMP2影响下，细胞增殖与时间的关系。

20 图4显示了在体外Adv-BMP2影响下，细胞增殖与Adv-BMP2剂量的相关性。

图5显示了受Adv-BMP2感染的间充质细胞在体外培养过程中碱性磷酸酶活性升高。

25 图6显示了受Adv-BMP2感染的间充质细胞在体外培养15-20天，有钙离子沉淀的发生。

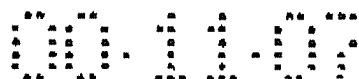
图7显示了在用本发明方法处理的小鼠中，新骨组织在大腿肌肉中生成的情况。其中图7A是无任何处理；图7B是注射未处理过的细胞；图7C是注射Adv- β gal处理过的细胞；图7D是注射Adv-BMP2处理过的细胞。

图8是对用本发明方法刺激生成的小鼠肌肉内新骨的组织学检查的照片。

30 图9显示了在用本发明方法处理的兔子脊柱部位新骨生成的情况。

图10是对用本发明方法形成的兔子新骨进行组织学检查的照片。

图11显示了在用本发明方法处理的猪脊柱椎体间新骨生成的情况。图中，



实心箭头：用 Adv-BMP2 转化后的细胞造成上下椎体融合；空心箭头：用 Adv- β gal 转化后的细胞不造成上下椎体融合(无变化)。

图 12 是对用本发明方法形成的猪新骨进行组织学检查的照片。其中，图 12A 显示组织学检查可见在椎体之间形成了新的骨组织；图 12B 显示了正常椎体之间的软体组织。

发明详述

本发明的发明点在于：采用基因转移(基因治疗)的手段，将 BMP 基因转入间充质细胞内。利用间充质细胞作为制备工厂持续性地产生 BMP 蛋白。当转入 BMP 基因的间充质细胞被置入体内后，间充质细胞产生的 BMP 蛋白可以刺激转导间充质细胞自分泌刺激(autocrine)或者使受者体内其他的间充质细胞旁分泌刺激(paracrine)，从而使间充质细胞分化发育生成新骨。

如本文所用，“骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)”包括骨形态发生蛋白家族中的任何成员，目前 BMP 基因家族逐步发现了 14-15 个相似基因，它们都具有刺激骨头生成的功能。任何 BMP 蛋白都可用于本发明。较佳地，骨形态发生蛋白选自：BMP-2、BMP-4、BMP-7。更佳地，所述的骨形态发生蛋白是 BMP-2。

如本文所用，“复制缺陷型病毒”指作为载体的病毒感染细胞后，不能自我复制。

如本文所用，“间充质细胞”指各种具有分化发育成骨细胞、骨前体细胞的细胞，它包括各种干细胞、前体细胞和普通的间充质细胞。

任何在本领域中用作载体的病毒都可用于本发明，尤其是是已经在基因治疗领域中使用的病毒，如腺病毒、腺伴随病毒和逆转录病毒。较佳地这些病毒是复制缺陷型病毒。

本发明适用于所有的哺乳动物，其中包括(但不限于)：人、狗、猫、羊、牛、马、猪、老虎等。本发明可用于医学、兽医学领域。

在本发明中，首先构建含 BMP 基因的载体。这可以用常规方法完成。

在构建了含 BMP 基因的载体(如病毒)后，可用常规技术将含 BMP 基因的病毒和间充质细胞的结合，即利用病毒载体将 BMP 基因导入间充质细胞。这是本发明极为重要的一步。用间充质细胞作为 BMP 基因的受体细胞，不仅可以产生

00.11.07

自分泌刺激和旁分泌刺激效应。同时又能在体内外持续地产生 BMP 蛋白和效应，从而提供优异的刺激骨生成的效果。

获得了转入 BMP 基因的间充质细胞之后，便可进一步培养可获得更多的细胞，或者冷冻备用，或者直接将其用于刺激骨生成。

5 刺激骨生成的方式有两大类。一类是利用体外组织工程。用本发明的上述的转入 BMP 基因的间充质细胞，可以在通过常规的体外培养技术而生成组织。已表明，本发明的间充质细胞在体外培养过程中可分化发育成成骨母细胞 (osteoblast)。在本发明的一个实施例中，已经显示了在体外形成了骨及骨组织前体。

10 另一类是直接在临床上应用。它包括制造一种用于植入哺乳动物体内以刺激骨头生长的接种物，它含有本发明上述的导入了 BMP 基因的间充质细胞。一种接种物的例子就是含导入了 BMP 基因的间充质细胞的混悬液。然后，通过例如直接注射或手术方式，将所述的接种物植入哺乳动物体内需要骨生成的部位，以刺激骨生成，从而形成新骨。本发明在临床上的应用范围可涵盖骨外科、整形外科和神经外科，以及所有临床上应用骨组织、骨生成、骨融合的场所。

15 具体地，本发明有如下具体应用场合：

1、临床上常见有骨折后不能愈合的病例。Adv-BMP2 转导的间充质细胞可用于直接注射入骨折不愈部位，产生自分泌刺激和旁分泌刺激效应促进骨折愈合。

20 2、骨科与整形外科的临床治疗上经常要从病人身上的某个部位截取骨骼，用于其它的手术部位。本发明方法可以省却此截取骨骼手术，减少病人痛苦，尤其对在体能上已不能再承受额外手术的病人，提供新的治疗机会。

3、本发明还可用于在骨科与整体外科的骨肿瘤手术后，缺失部位的重新填充生长新骨。

25 4、本发明可用于体外组织工程。在体外生成骨或骨组织的前体结构，植入体内后迅速成骨。

5、骨科脊椎融合手术。传统方法使用钢板固定或自体骨。本方法可用注射法省却手术造成脊椎融合。

6、所有其它使用骨组织，促使骨组织生成的场合，都可使用本发明方法。

30

本发明具有如下优点：

(1)不须在体外表达和分离纯化 BMP 蛋白，从而省却了工厂化制备 BMP 的过

00-11-07

程和成本。

(2)接受基因转移的间充质细胞在体内外能持续地产生 BMP 蛋白而维持持续的生物活性作用，从而避免了以往 BMP 蛋白植入体内后迅即消化失活的问题。

(3)基因转移后的间充质细胞可以用直接注射或手术的方法植入体内，从而消除了必须使用固体载体的障碍，因而减少了临床应用的限制。此外，对病人造成的痛苦小于现有技术。

(4)担当基因转移的腺病毒因其自身的抗原性可引发受者体内的免疫反应，最终予以清除。因此，避免了基因转移后的间充质细胞在体内无限制地刺激生骨的后果。

10

下面结合具体实施例，进一步阐述本发明。应理解，这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件，例如 Sambrook 等人，分子克隆：实验室手册 (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) 中所述的条件，或按照制造厂商所建议的条件。

15

实施例

(1)构建携带 BMP-2 基因的重组腺病毒

人 BMP-2 基因来自 ATCC(美国典型培养物保藏中心)。用分子克隆手段将人 BMP-2 基因插入表达质粒 PAC 中形成质粒 PAC-BMP2。在此质粒中，BMP-2 基因受巨细胞病毒早期启动子/增强子(cytomegalovirus, early gene promoter/enhancer)的控制。用 XhoI 将 PAC-BMP2 切割成线状。

将纯化制备的腺病毒 5 型(adenovirus type 5)用蛋白酶 K 消化(56 °C，过夜)，以降解病毒蛋白外壳释放出病毒的基因组 DNA。用 Cla I 内切酶对腺病毒的基因组 DNA 进行消化(37 °C，60 分钟)，从而产生一大，一小两个 DNA 片段。用琼脂电泳法分离这二个片段然后收获大的 DNA 片段称为 Cla I 大片段。

用 lipofectamine 将 Xho I 切割后的 PAC-BMP2 和腺病毒 Cla I 大片段共转染(co-transfection)入 293 细胞内。10 天后点取形成的病毒空斑。经进一步的空斑纯化和扩增后，此重组腺病毒称为 Adv-BMP2(构建过程见图 1)。

该重组腺病毒 5 型 Adv-BMP2 于 2000 年 7 月 11 日保藏于中国典型培养物保藏中心(CCTCC，中国，武汉市)，CCTCC 保藏号为 V200004。

30

00-11-07

实施例 2

将 BMP 基因转入间充质细胞

重组的腺病毒已经失去在普通细胞内的增殖和杀死细胞的功能。只作为载体可将其携带的 BMP-2 基因转移入细胞。用 Adv-BMP2 感染各种间充质细胞(包括
5 小鼠 C3H10T1/2 细胞和兔及猪的骨髓间充质细胞), 然后在体外培养 5 天。

收集细胞培养液, 用特异性抗人 BMP2 的抗体进行免疫沉淀 (immunoprecipitation) 后作免疫印染 (Western blot) 试验。在 Adv-BMP2 感染的细胞培养液中可见特异的 BMP-2 条带。而在其它对照组中则无。这表明 Adv-BMP2 介导的 BMP-2 基因转移可以在间充质细胞内产生人 BMP-2 蛋白(图 2)。

10

实施例 3

Adv-BMP2 转染后的间充质细胞在体外的分化发育

用 Adv-BMP2 感染各种间充质细胞(如小鼠、兔及猪)后, 在体外培养过程中, 受染的间充质细胞出现下述变化:

15 A、间充质细胞数目。增殖受染后的间充质细胞在培养后的第 7 天可对比对照间充质细胞(未处理过的间充质细胞和无活性重组腺病毒感染间充质细胞)增殖 3 倍数目(图 3)。而且间充质细胞增殖的效应与 Adv-BMP2 的用量成正比(图 4)。Adv-BMP2 用量大, 间充质细胞增殖多, 反之则少。

20 B、间充质细胞分化。受 Adv-BMP2 感染的间充质细胞在体外培养过程中会向成骨母细胞分化。其标志为碱性磷酸酶活性升高。对照间充质细胞则维持碱性磷酸活性不变(图 5)。

25 C、钙离子沉淀。受 Adv-BMP2 感染的间充质细胞在体外培养 15-20 天, 可呈现 Van Cossa 染色阳性, 这标志着钙离子沉淀的发生。此现象为典型的体外成骨母细胞/成骨细胞的又一标志。而对照间充质细胞无此反应(图 6)。

25

实施例 4

Adv-BMP2 转导后的间充质细胞在体内生成新骨

将 Adv-BMP2 转导后的间充质细胞植入动物体内可生成新骨, 植入的方法可是直接注射或手术放入

30 A、在小鼠体内生成新骨

当将 Adv-BMP2 转导后的 C3H10T1/2 细胞注射入小鼠的股部肌肉后三周。X 光检查可在注射部位的肌肉内发现新骨(图 7)。用组织学检查进一步确认在肌肉

00-11-07

内生成的新骨具有完整的各种骨组织形态,如骨细胞、软骨细胞、骨髓腔隙(图 8)。对照组无变化。

B、在兔子体内生成新骨

5 当将 Adv-BMP2 转染后的自身兔骨髓间充质细胞用手术方法植入兔背部的脊柱骨部位。4-5 周后的 X 光检查可见新骨生成(图 9)。进一步的组织学检查确认完整的骨组织形态(图 10)。对照组无变化。

C、在猪体内生成新骨

10 当将 Adv-BMP2 转导后的自身猪骨髓间充质细胞用手术方法植入脊柱椎体间的空隙。6 周后 X 光检查可在椎体间隙中发现新形成的骨(图 11)。新生成的骨组织可将上下椎体连成一体造成融合。组织学检查确认新骨的组织学特征(图 11, 图 12A 和 12B)。对照组的椎体间隙维持原有的软组织构造。X 光及组织学检查无变化。

15 应理解,在阅读了本发明的上述讲授内容之后,本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改,这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

说明书附图

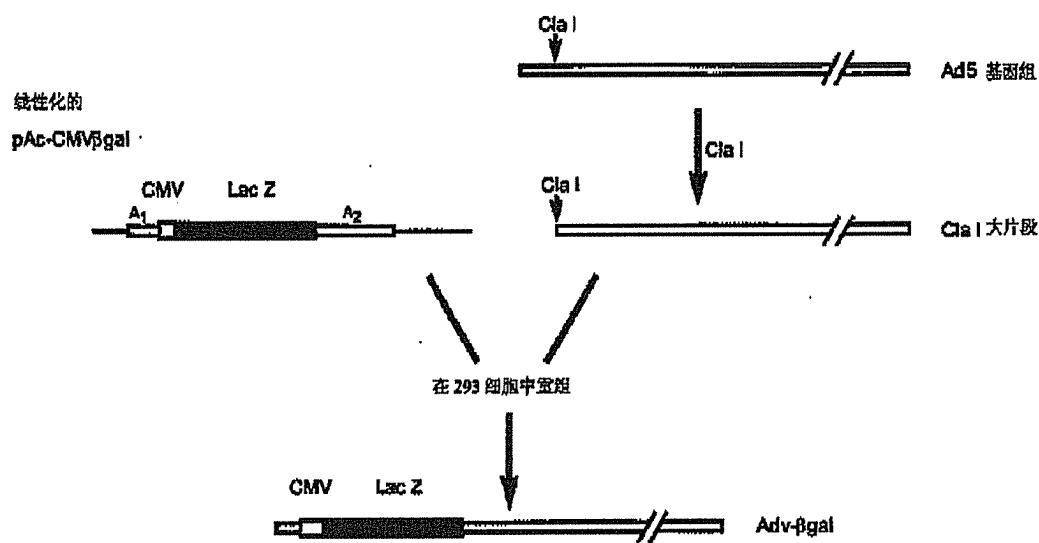


图 1

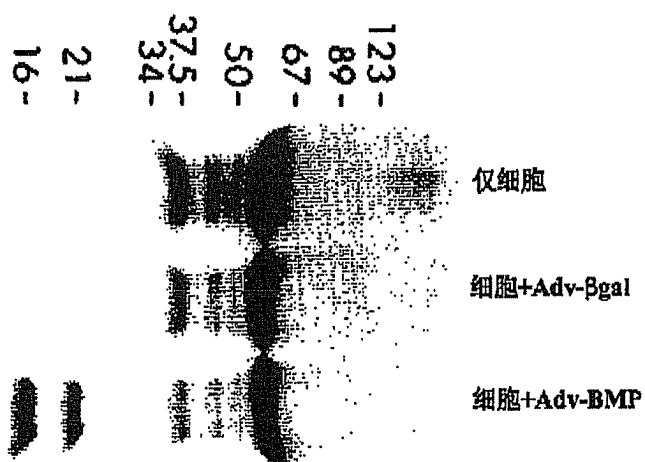


图 2

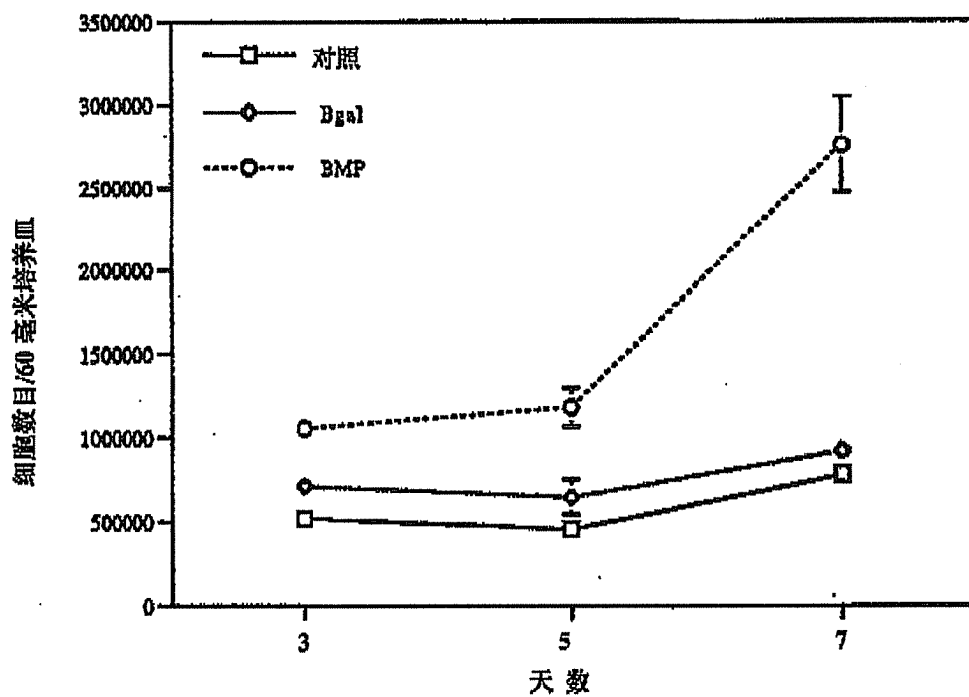


图 3

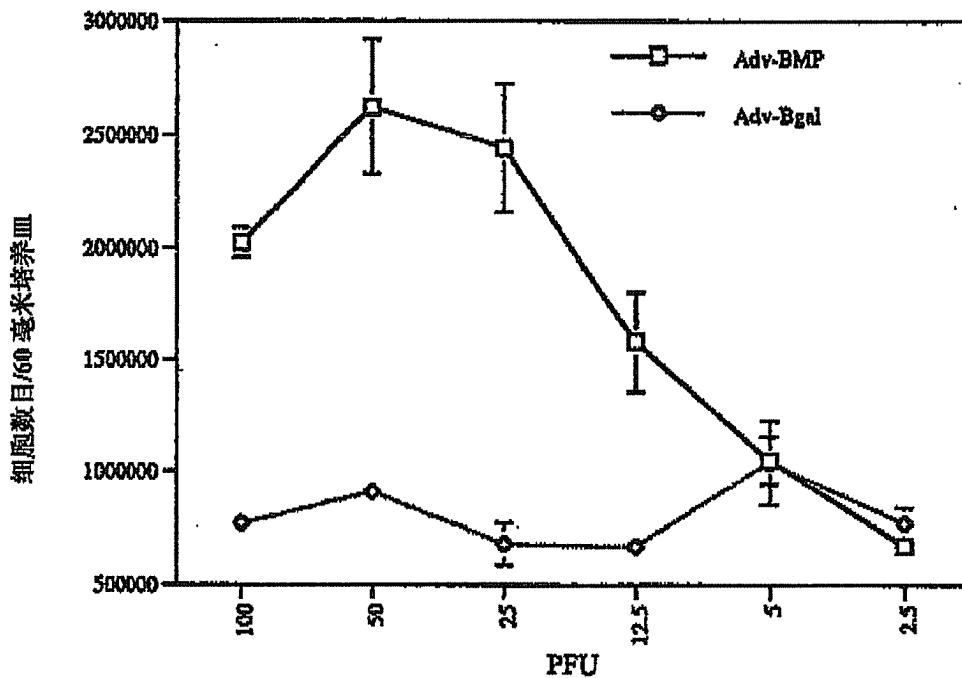


图 4

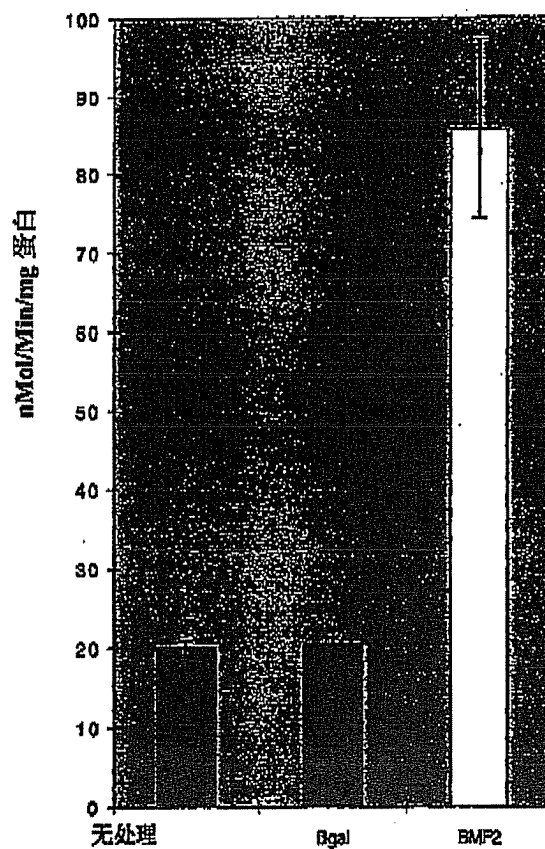


图 5

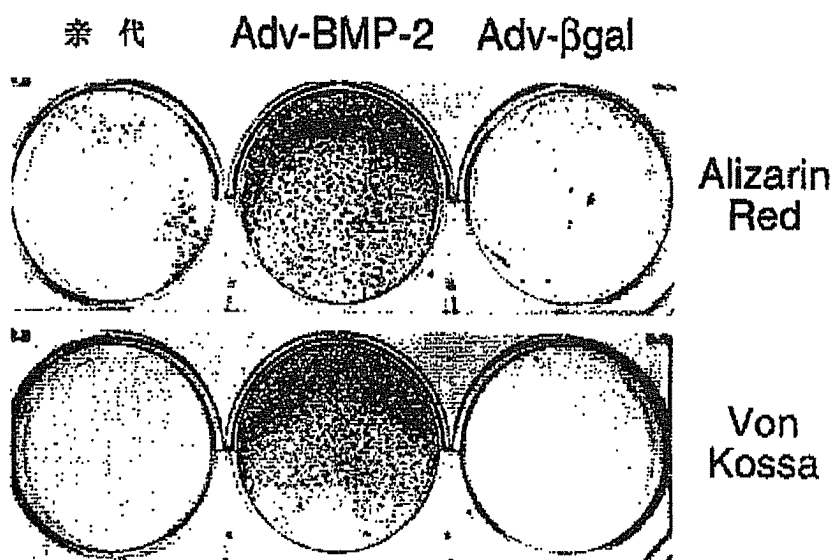


图 6

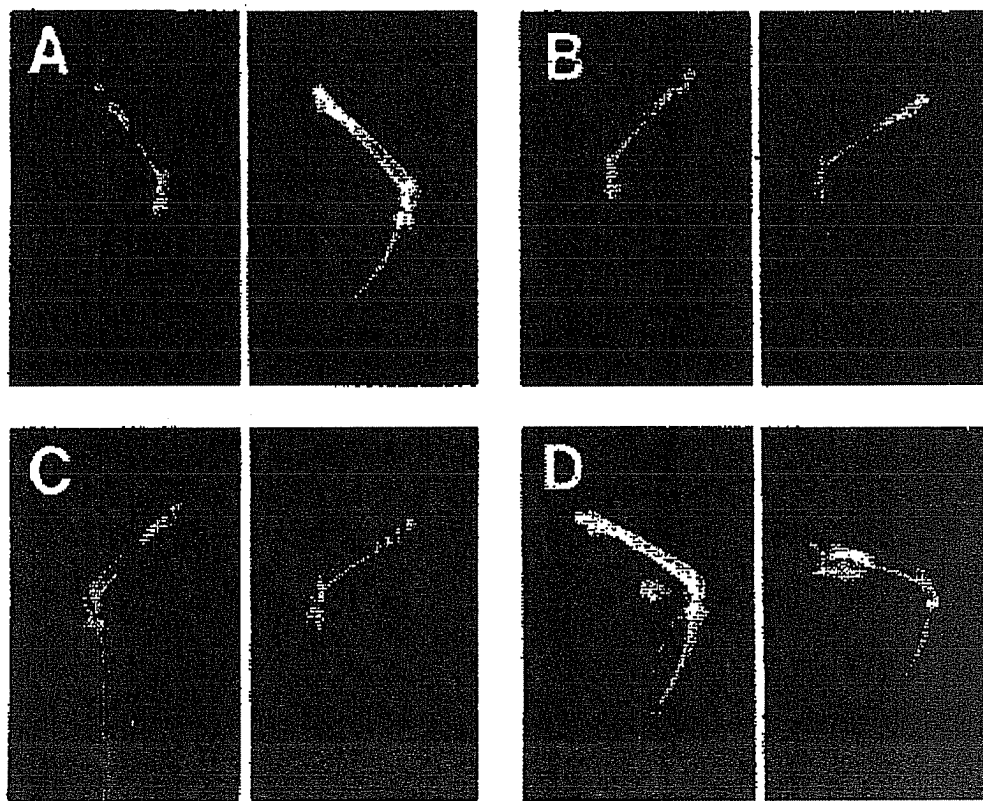


图 7

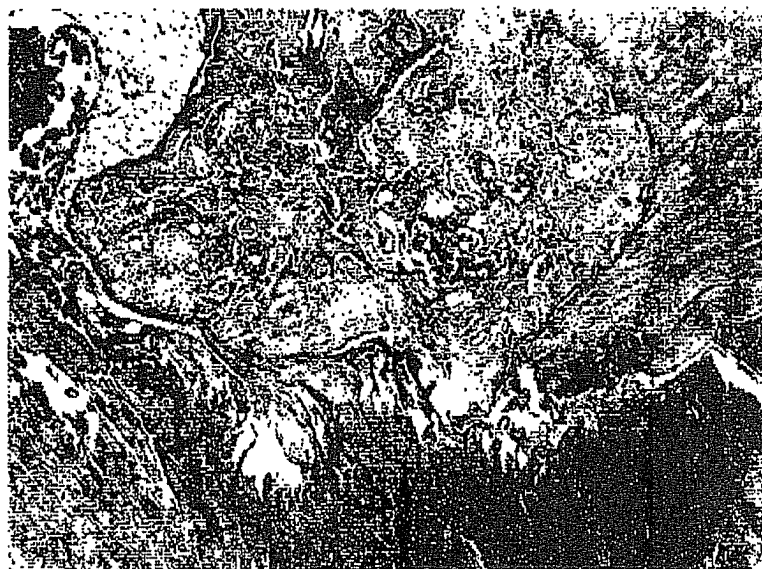


图 8

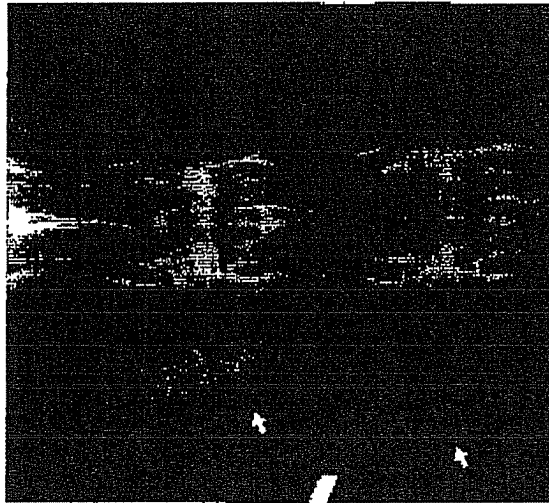


图 9



图 10

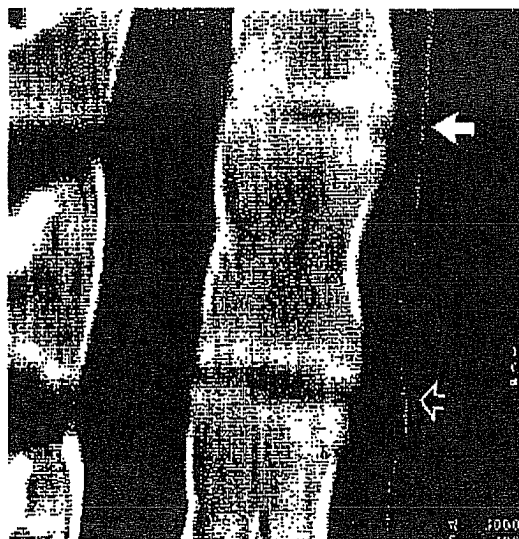


图 11



图 12A

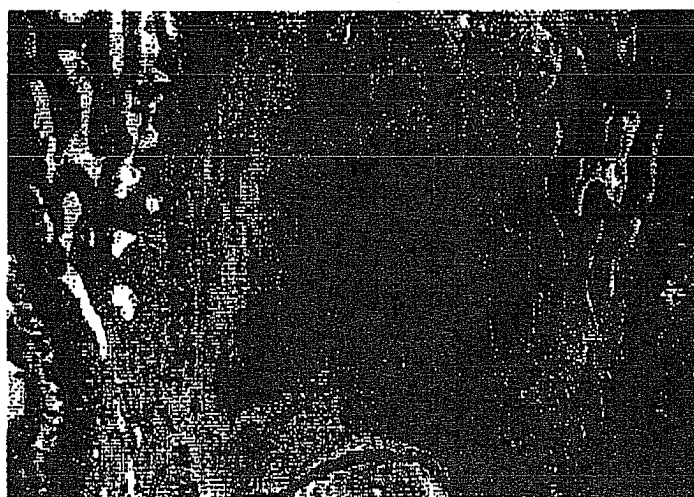


图 12B